

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

24.05.99

EAKU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 5月25日

09/701001

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第159957号

出 願 人
Applicant (s):

旭化成工業株式会社
旭メデイカル株式会社

REC'D 09 JUL 1999

WIPO PCT

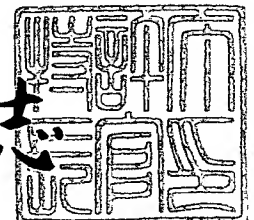
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3041166

【書類名】 特許願

【整理番号】 X10-594

【提出日】 平成10年 5月25日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C07K 16/28

【発明の名称】 細胞の分離装置及び分離方法

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市北区東大曾根町上3丁目1020-2

 【氏名】 宮村 耕一

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

 【氏名】 大野 満春

【特許出願人】

 【識別番号】 000000033

 【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 000116806

 【氏名又は名称】 旭メディカル株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100090941

 【氏名又は名称】 藤野 清也

 【電話番号】 3226-6671

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 014834

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

特平 10-159957

【物件名】

要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞の分離装置及び分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 キメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いた細胞分離装置。

【請求項 2】 H鎖可変領域のCDR-1が配列表配列番号：5、CDR-2が配列番号：6、CDR-3が配列番号：7で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1が配列番号：8、CDR-2が配列番号：9、CDR-3が配列番号：10で表されるアミノ酸配列であり、Fc領域がヒト型である抗体を用いたヒトCD34陽性細胞に対する細胞分離装置。

【請求項 3】 H鎖可変領域のCDR-1が配列表配列番号：5、CDR-2が配列番号：6、CDR-3が配列番号：7で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1が配列番号：8、CDR-2が配列番号：9、CDR-3が配列番号10で表されるアミノ酸配列である1本鎖抗体を用いたヒトCD34陽性細胞に対する細胞分離装置。

【請求項 4】 抗体のアミノ酸配列のC末端、N末端、またはそれらの両者に、塩基性アミノ酸または酸性アミノ酸を含むアミノ酸配列を付加して用いた請求項 1 から 3 のいずれかに記載の細胞分離装置。

【請求項 5】 キメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いた細胞分離または検出方法。

【請求項 6】 H鎖可変領域のCDR-1が配列表配列番号：5、CDR-2が配列番号：6、CDR-3が配列番号：7で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1が配列番号：8、CDR-2が配列番号：9、CDR-3が配列番号：10で表されるアミノ酸配列であり、Fc領域がヒト型である抗体を用いたヒトCD34陽性細胞に対する細胞分離または検出方法。

【請求項 7】 H鎖可変領域のCDR-1が配列表配列番号：5、CDR-2が配列番号：6、CDR-3が配列番号：7で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1が配列番号：8、CDR-2が配列番号9、CDR-3が配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有する1本鎖抗体を用いたヒトC

D 3 4 陽性細胞に対する細胞分離または検出方法。

【請求項 8】 抗体のアミノ酸配列の C 末端、N 末端またはそれらの両者に、塩基性アミノ酸または酸性アミノ酸を含むアミノ酸配列を付加して用いた請求項 5 から 7 のいずれかに記載の細胞分離または検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、組換え抗体、より具体的にはヒト CD (Cluster differentiation) 3 4 抗原に対する組換え抗体を利用した細胞の検出方法、細胞分離方法および、分離装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来ヒト CD 3 4 は、造血未分化細胞の細胞表面抗原として報告され、そのヒト CD 3 4 分子を認識する抗体の産生細胞として抗 MY 10 抗体産生ハイブリドーマが知られてきた (USP-4965204、及び J. Immunology 誌、133 巻、157 頁、1984 年)。その後、抗ヒト CD 3 4 抗体は多数報告され、また、骨髄移植などの医療分野において造血未分化細胞の分離などへの応用が図られている。こうした医療に向けた応用を有効に活用するため抗ヒト CD 3 4 抗体を効率よく生産し、それを利用した医療機器開発の必要が生じてきている。

【0003】

通常の抗体は大小 2 種類のポリペプチドからなり、その大きい方のサブユニットを「H 鎖」といい、小さい方のサブユニットを「L 鎖」という。また、それぞれのペプチドは N 末端側に存在して抗原結合部位を形成する「可変領域」（または「V 領域」）と、抗体のクラス別に一定の「定常領域」（または「Fc」）からなっている。可変領域は、更に、特に抗原結合部位の形成に密接に関係している相補性決定領域「CDR」とその間に介在する枠組領域「フレームワーク」に分けられる。CDR には、H 鎖と L 鎖のそれぞれについて、N 末端側から「CDR-1」「CDR-2」「CDR-3」と呼ばれる 3 つの領域が存在することが知られている。図 1 に Ig G の構造模式図を示す。

【0004】

CD34分子は、血液の未分化細胞上に発現する未分化細胞の抗原マーカーとして知られ、未分化細胞の分離への応用が報告されてきている(S.Saelandら、Blood 誌、72巻、1580頁、1988年など)。さらに、抗CD34抗体と、ビオチンやアビジン、または磁気ビーズとの組み合わせなどを利用し、未分化細胞を分化した細胞群および癌細胞から分離する医療機器の開発が行われつつある(Dregerら、ExpHematol. 誌、23巻、147 頁、1995年)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

抗体は、一般に抗原との結合性が強く、かつ特異性が高いことが知られ、医療への利用が期待されている。しかし、医療機器作成に際し、抗体の製造に掛かる費用が問題となっている。抗体を効率よく生産し、医療機器への応用を行うことが必要である。そのため、抗体を効率よく生産する方法として、組み換え抗体を作成する技術を確立し、それを医療機器へ応用することが期待される。

本発明の課題は、組換え抗体、具体的にはヒトCD34抗原に対する新規な抗体を用いて、細胞、特にヒトCD34陽性細胞を分離する装置及びその装置を使用する該細胞の分離方法あるいは検出方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

生体内に存在する通常の抗体は、抗原特異的な可変領域塩基配列及び定常領域遺伝子の2つが必要である。定常領域遺伝子には少数のクラスが知られるが、H鎖L鎖の可変領域塩基配列は極めて多様性が高く、目的とする可変領域塩基配列の取得は非常に労力を要する。しかしながら、本発明者らは、遺伝子増幅(PCR)やフローサイトメーターによる結合実験を駆使することにより、ハイブリドーマ中の複数の抗体遺伝子の中から目的であるヒトCD34抗原に対する遺伝子を取得するに至り、次の通りその配列と機能を決定した。さらに、その遺伝子を組み換えてヒトマウスキメラ抗体、1本鎖抗体を大量に生産することを可能にした。

【0007】

即ち、抗MY10抗体のH鎖の可変部位の遺伝子配列およびそれがコードするアミノ酸配列を、配列表配列番号1に示す。配列表配列番号1のアミノ酸1位から30位はフレームワーク1、31位から35位はCDR-1、36位から49位はフレームワーク2、50位から65位はCDR-2、66位から97位はフレームワーク3、98位から106位はCDR-3、107位から117位はフレームワーク4を示す。

【0008】

また、MY10抗体のL鎖の可変部位の遺伝子配列およびそれがコードするアミノ酸配列を、配列表配列番号2に示す。配列表配列番号2のアミノ酸1位から23位はフレームワーク1、24位から39位はCDR-1、40位から54位はフレームワーク2、55位から61位はCDR-2、62位から93位はフレームワーク3、94位から102位はCDR-3、103位から113位はフレームワーク4を示す。

【0009】

1本鎖抗体の遺伝子配列およびそれがコードするアミノ酸配列を、配列表配列番号3に示す。配列表配列番号3のアミノ酸配列1位から39位は大腸菌から分泌用シグナルを含む配列、40位から156位はH鎖の可変領域、157位から171位はリンカー、172位から284位はL鎖の可変領域、285位から302位まではE-tagを含む配列を示す。

【0010】

pCANTAB5E プラスミド（ファルマシア社）は、リンカーとしてH鎖L鎖の一部を含む配列つまり140位から169位が用意されており、本発明ではその配列を利用した。

H鎖及びL鎖と結合するリンカーは、本発明におけるプラスミドに含まれるが、このような配列に限定されずに利用することができる。ハイブリドーマから1本鎖抗体を単離する方法は、Recombinant Phage Antibody System キット（ファルマシア社）などを利用することが可能な場合もあるが、本発明のようにスクリーニングに必要なヒトCD34抗原が無い場合、キットを有効に使用できず多くの工夫を要する。

【0011】

本発明は、次の細胞分離装置及びこれを使用する細胞の分離方法あるいは検出

方法に関する。

(1) キメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いた細胞分離装置。

(2) H鎖可変領域のCDR-1がSer-His-Gly-Val-His(配列表配列番号: 5)、CDR-2がVal-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser (配列番号: 6)、CDR-3がAsn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr(配列番号: 7)で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1がArg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His(配列番号: 8)、CDR-2がLys-Val-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe(配列番号: 9)、CDR-3がSer-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr(配列番号: 10)で表されるアミノ酸配列であり、Fc領域がヒト型である抗体を用いた細胞分離装置。

(3) H鎖可変領域のCDR-1がSer-His-Gly-Val-His(配列表配列番号: 5)、CDR-2がVal-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser (配列番号: 6)、CDR-3がAsn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr(配列番号: 7)で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1がArg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His(配列番号: 8)、CDR-2がLys-Val-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe(配列番号: 9)、CDR-3がSer-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr(配列番号: 10)で表されるアミノ酸配列である1本鎖抗体を用いた細胞分離装置。

(4) 抗体のアミノ酸配列のC末端、N末端またはそれらの両者に、塩基性アミノ酸または酸性アミノ酸を含むアミノ酸配列を付加した抗体を用いた前記(1)~(3)のいずれかの細胞分離装置。

【0012】

(5) キメラ抗体、1本鎖抗体、またはそれらを組合せた抗体を用いたヒトCD34陽性細胞の分離方法または、当該細胞の検出方法。

(6) H鎖可変領域のCDR-1がSer-His-Gly-Val-His(配列表配列番号: 5)、CDR-2がVal-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser (配列番号: 6)、CDR-3がAsn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr

r(配列番号：7)で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1がArg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His(配列番号：8)、CDR-2がLys-Val-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe(配列番号：9)、CDR-3がSer-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr(配列番号：10)で表されるアミノ酸配列であり、Fc領域がヒト型である抗体を用いたヒトCD34陽性細胞の分離方法または該細胞の検出方法。

(7) H鎖可変領域のCDR-1がSer-His-Gly-Val-His(配列表配列番号：5)、CDR-2がVal-Ile-Trp-Gly-Ala-Gly-Arg-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-Ile-Ser(配列番号：6)、CDR-3がAsn-Arg-Tyr-Glu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Tyr(配列番号：7)で表されるアミノ酸配列であり、L鎖可変領域のCDR-1がArg-Ser-Ser-Gln-Asn-Leu-Val-His-Ser-Asn-Gly-Asn-Thr-Tyr-Leu-His(配列番号：8)、CDR-2がLys-Val-Ser-Asn-Arg-Phe-Ser-Gly-Val-Pro-Asp-Arg-Phe(配列番号：9)、CDR-3がSer-Gln-Ser-Thr-His-Val-Pro-Leu-Thr(配列番号：10)で表されるアミノ酸配列を含有する1本鎖抗体を用いたヒトCD34陽性細胞の分離方法または該細胞の検出方法。

(8) 抗体のアミノ酸配列のC末端、N末端またはそれらの両者に、塩基性アミノ酸または酸性アミノ酸を含むアミノ酸配列を付加して用いた前記(5)～(7)のいずれかのヒトCD34陽性細胞の分離方法または該細胞の検出方法。

【0013】

本発明でいう「抗体」とは、通常生体内に存在する形の抗体の他に、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域もしくはその組み合わせで形成される抗原結合部位を少なくとも1つ含む分子を含む。例えば、H鎖の可変領域のみ含むペプチド、1組のH鎖とL鎖からなるFab、2組のH鎖断片とL鎖からなる(Fab')₂、H鎖断片とL鎖が同一ペプチド上に直列に結合した1本鎖抗体「ScFv」なども含まれる。

【0014】

本発明でいう「キメラ抗体」とは、異なる動物種の抗体のアミノ酸配列を人為的に組み合わせた抗体を示す。例えば、マウスハイブリドーマ由来のCDRを含み、定常領域にヒト抗体由来アミノ酸配列を含む抗体を示す。さらに、フレーム

ワークにヒト由来のアミノ酸配列を含めることもできる。

本発明でいう「ヒトCD34抗原」とは、Civin らによりに報告(USP-4965204、及びJ.Immunology誌、133 巻、157 頁、1984年)され、血液の未分化細胞上に発現する造血未分化細胞の抗原マーカーとして知られている。

【0015】

本発明でいう「実質的に同じ機能」とは、抗原分子上のエピトープ、抗原との結合力が実質上同じであることをいう。可変領域のフレームワークや定常領域におけるアミノ酸置換があったとしても、しばしば本質的に同じ性能の抗体を生成することが知られている。抗体の抗原特異性と抗原への結合の強さが、主にCD Rのアミノ酸配列によって決定されることはマウス抗体のヒト化で示されている(Gussow, D. and Seemann, G., Methods in Enzymology, 203:99-121(1991); Glaser, S.M. et al., J.Immunology 149:2607-2614(1992))。

【0016】

組換え抗体の産生方法として、例えばCOS7細胞による抗体の発現には、種々のベクターが使用可能であり(Whittle, N. and Adair, J. et al. (1987), Protein Eng., 1(6), 499-505.; Sutter, K.D. and Feys, V. et al. (1992), Gene 113, 223-30.)、例えばヒト抗体の発現プラスミド(pG1)を利用し、ヒトマウスキメラ抗ヒトCD34抗体を発現し得るプラスミドpG1My10を作成できる。これをCOS7細胞へ遺伝子導入し、ヒト抗CD34抗体の生産を行える。ここで言う、ヒトマウスキメラ抗体とは、可変領域がハイブリドーマ由来のマウス遺伝子配列であり、定常領域がヒト由来の遺伝子配列から構成される遺伝子によって生産された抗体を示す。発現プラスミドpG-1は、国際公開公報W095/15393に記載のpSEプラスミドのヒトC γ 1の配列に付加された膜通過ドメイン(TM)を除去して、通常の抗体の様に生体内に分泌されるように改良したプラスミドである。その作成の詳細は、参考例として記してある。つまり、ヒト定常領域をコードする遺伝子配列を有しており、マウス可変領域遺伝子をつなぐことにより、ヒトマウスキメラ抗体を発現しうるプラスミドである。

【0017】

COS7細胞は、通常10%ウシ胎児血清(FCS)添加 Dulbecco's Modified Eagle'

s Medium (DMEM培地) を用い、5% CO₂ 存在下37℃で培養する。COS7細胞への遺伝子導入法や遺伝子導入後の細胞の育種生産法は、バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法; 横田 崇、新井 賢一、羊土社(1994)等の実験書に記載されている。COS7細胞への遺伝子導入法は、電気穿孔法、DEAEデキストラン法(Bebbington,C.R.(1991); METHODS: A Companion to Methods in Enzymology,2(2),136-45.) 等で行なうことができる。

【0018】

本発明の実施によれば、発現プラスミドpG1 に組み込まれた定常領域遺伝子がC γ 1であるため、各クローンはIgG1として発現する。抗体の生産時には、血清由来のウシ抗体の混入を避けるために、無血清のDMEM培地によって培養することが望ましい。こうして培養上清中に分泌された抗CD34抗体は、例えばプロテインAやプロテインGを用いる一般的なIgG抗体の精製法によって容易に精製することができる。工業生産の場合の宿主としてはCHO細胞、ミエローマSp2/0細胞がよく知られている(Xiang,J. et al.(1990) Mol.Immun., 27,809; Bebbington,C.R. et al.(1992) Bio/technology,10,169;Larrick,J.W.and Wallace,E.F. et al.(1992) Immunol.Rev.130,69-85.; Deyev,S.M.andLieber,A. et al.(1994) Appl.Biochem.Biotechnol.47(2-3),143-54.)。

例えばCHO細胞では、MTX等の薬剤により生産性の高いクローンを選択する方法も報告されており(Bebbington,C.R.(1991) METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2(2),136-45.)、安定な高生産株が取得できれば、その株を組換え抗ヒトCD34抗体の工業的生産に利用できる。

【0019】

抗体の形状として、生産抗体分子をそのまま利用することも可能であるが、各種プロテアーゼ処理により得られる抗原結合部位を含む断片であるFab、F(ab')₂、FvあるいはFdなども適用することができる。これらの断片については、「抗体工学入門」(金光著、p20-22、地人書館)などに説明がされている。その他にも本発明をヒト体内の血液を体外循環に応用する場合には抗体が血液中に遊離した際の副作用、抗原性などを考慮して可変領域以外の部分をヒト型抗体にするようなキメラ抗体を用いることも有用である。これら抗体の作製方法は特に限定

されるものではないが、高純度に精製されたものを用いなければならない。モノクローナル抗体の生産方法は、通常行なわれているハイブリドーマをマウスの腹腔で増殖させ腹水から生産された抗体を回収する方法、もしくは、無血清培地で培養した培養上清から得る方法でよい。断片ペプチドの場合には抗体分子の酵素処理により得ることができるが、遺伝子工学的な手法により細菌、酵母などに産生させることも可能である。これらの方法により得たモノクローナル抗体、モノクローナル抗体由来抗体断片、ペプチド等を組み合わせることにより、より強固な結合性を生じる。

【0020】

CD34分子は、Civinらによりに報告(USP-4965204、及び J.Immunology 誌、133 巻、157 頁、1984年)され、血液の未分化細胞上に特異的に発現する未分化細胞の抗原マーカーとして知られている。この抗原マーカーを利用し、未分化細胞を分離する試みが報告されてきている(S.Saelandら、Blood 誌、72巻、1580 頁、1988年など)。さらに、抗CD34抗体と、ビオチンやアビジン、または磁気ビーズとを組み合わせ、未分化細胞を分化した細胞群および癌細胞から分離する医療機器の開発が行われつつある(Dregerら、ExpHematol. 誌、23巻、147頁、1995年)。

【0021】

本発明で分離される造血未分化細胞(CD34陽性細胞)とは、特定の刺激により増殖可能な細胞であり、赤血球、単球、顆粒球、リンパ球、マクロファージなどの成熟した細胞群を1種類以上に分化しうる細胞を示している。特に、半固形培地にて適当な増殖因子存在下で培養した場合、コロニーを形成する未分化な血液細胞及び、全ての系列への分化能と自己増殖能を有する造血幹細胞を含む。その細胞は、骨髓や臍帯血に豊富に含まれている。また、その細胞は、末梢血中にも含まれるが、顆粒球コロニー形成因子(G-CSF)などのサイトカインを投与することで、末梢血中に誘導することもできる。また、これらの細胞を培養することにより、造血未分化細胞を体外で増殖させる技術も報告されつつある。これらの造血未分化細胞を含む、細胞懸濁液は、本発明により造血未分化細胞を分離する材料となりうる。

本発明の細胞分離装置を医療機器として利用し、造血未分化細胞の分離を行うことができる。体外において血液細胞懸濁液から、もしくは体外循環により血液から効率よく造血未分化細胞を分離でき、分離した細胞は種々の疾患の治療に用いることが可能となる。

【0022】

血液のようにさまざまな細胞種を含む溶液から、必要とする造血未分化細胞を単離または濃縮し、もしくは必要としない細胞を除去することは、医療効果を高める上で有効な手段である。骨髓移植とは、骨髓破壊した白血病患者などの癌患者、再生不良性貧血など先天性免疫疾患の患者に対し、正常な造血未分化細胞を移植する方法であり、これらの患者に対する有効な治療法の一つとして定着しつつある。最近では、造血未分化細胞は骨髓からだけでなく、末梢血や臍帯血から得る方法が用いられる。同種骨髓移植は、白血球型であるHLA型がほぼ一致した健常人から回収した骨髓液を、抗癌剤または、放射線で骨髓破壊した患者へ輸注する方法であるが、その問題点として、拒絶反応であるGVHD（移植片体宿主病）を引き起こすことである。そのため、近年造血系の悪性腫瘍、癌の治療において行なわれる自家骨髓移植療法、または、同種骨髓移植法の結果引き起こされる移植片対宿主病(GVHD)予防のために、造血未分化細胞の分離の需要が高まってきている。

【0023】

現在、細胞の分離方法として、抗体を利用して特異的に目的の細胞だけを分離する方法が開発されつつある。例えば、蛍光抗体標識細胞分離法、水不溶性担体に目的細胞と親和性を有するリガンドを固定化しこれに目的細胞を直接的または間接的に結合させる方法、免疫吸着カラムによる分離および免疫磁気ビーズによる分離法などがある。

蛍光抗体標識細胞分離法は、最初に細胞混合液を目的とする細胞に発現されている膜抗原を認識する蛍光標識したモノクローナル抗体とインキュベートした後、処理した細胞にセルソーターなどでレーザー光を照射することにより抗体が結合した細胞のみが蛍光を発することを応用して、蛍光抗体が結合した細胞を分離する方法である。

【0024】

目的細胞の膜表面に存在する抗原に対するモノクローナル抗体を直接分離装置表面に固定化して用いる方法、および最初に細胞混合液を目的細胞上の膜抗原に結合するモノクローナル抗体とインキュベートして、それから細胞表面上の抗体に結合する抗イムノグロブリン抗体のようなりガンドを固定化した細胞分離装置で処理する方法が国際公開公報W087-04628に記載されている。細胞分離は担体または装置に固定化されたモノクローナル抗体に対して、該抗原陽性細胞が直接もしくは、間接的に結合することで行なわれる細胞分離方法である。これらの方法は、抗体を固定化したプラスチックシャーレ上で分離されるもので、細胞混合液は最初抗体を固定化したプラスチックシャーレ上に注がれ、抗体と目的細胞上の膜抗原とを結合させるためにインキュベートされる。インキュベート後プラスチックシャーレを洗浄して結合していない細胞を除去して分離する。免疫吸着カラム法は目的細胞上の膜抗原に対する抗体などのリガンドをビーズ表面に固定化しこれをカラムに充填して細胞分離を行なうものである。

【0025】

目的細胞上の膜抗原に対する抗体をビオチン標識したものを細胞混合液中に加えて、インキュベートすることにより細胞-抗体-ビオチン結合を形成させた後、多孔質アクリルアミドゲルにアビジンを固定化したビーズを充填したカラムを通過させビオチン-アビジンの強力な結合を利用して目的細胞をカラム内に結合させて分離する方法が国際公開公報W091-16116に記載されている。

免疫磁気ビーズ法は最初に細胞混合液を抗体の結合した磁気ビーズとインキュベートすることにより目的細胞を磁気ビーズで標識する。標識後磁気装置を用いて標識されていない細胞から標識細胞を分離する。

【0026】

例えば、あらかじめ細胞に固定化させる抗体にビオチンや、磁気ビーズを結合させておき、次にそのビオチンや磁気ビーズと結合しやすい物質、例えばアビジンや磁気を結合または含む水不溶性担体と反応させることにより、容易に細胞が結合した水不溶性担体を回収することができる。また、目的の造血未分化細胞にCD34抗体を反応させておき、抗イムノグロブリン抗体を結合した水不溶性担

体と反応させ、水不溶性担体を洗浄または回収することで選択的に目的の細胞だけを分離することができる。水不溶性担体である磁気ビーズに固定化した抗体を利用すれば、磁石等により分離を効率化することもできる。本発明に用いられる容器形状として、水不溶性担体を充填したカラム、フラスコ状あるいは、フラスコ状ケースに水不溶性担体を充填したものが例示される。これらの容器形状とこれらの抗体を直接または、間接的に固定化した不溶性担体との組み合わせにより造血未分化細胞の分離器を作成しうる。また、これらの分離器は、細胞懸濁液や、生理食塩水などを流すポンプと組み合わせることにより、細胞分離システムとして利用性の高いものにすることができる。

【0027】

抗体を水不溶性担体に固定化する際に、抗体と水不溶性担体との間にスペーサーを介して結合することも有用である。更に、必要に応じて水不溶性担体と化合物を任意の長さの分子（スペーサー）を介して結合させてもよい（スペーサーの詳細に関しては、例えば、アフィニティクロマトグラフィー（笠井献一ら、東京化学同人出版、1991年、105～108 頁）を参照）。

スペーサーの例として、ポリメチレン鎖及びポリエチレングリコール鎖等が挙げられる。スペーサーの長さは 500 Å 以下であることが好ましく、200 Å 以下であることが更に好ましい。スペーサーを介して水不溶性担体に化合物を結合させる方法としては、例えば、水不溶性担体としてアガロースを用いる場合、アガロースの水酸基とスペーサーとして用いるヘキサメチレンジイソシアナートの片側のイソシアナート基を反応、結合させ、残ったイソシアナート基と抗体のアミノ基、水酸基又はカルボキシル基等を反応、結合させる方法が挙げられる。

【0028】

本発明でいう水不溶性担体とは、常温の水溶液中で固形状体にあるものをいい、いずれの形状であってもよい。形状を例示すると球状、立方状、平面状、チップ状、繊維状、平膜状、スポンジ状、中空糸状のものが挙げられる。これらの内、細密充填のしやすさ、抗体を比較的均質に表面に保持しやすい点、実有効面積を比較的多く確保できる点、及び細胞懸濁液の流通面から、球状及び粒状のものが望ましい。

【0029】

水不溶担体の材質は、表面に抗体を保持できるものであれば、無機化合物、有機化合物を問わないが、細胞懸濁液との接触時に溶出物が少ないこと、形状の制御がより容易なことから有機高分子化合物が望ましい。このような例として、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメタクリレートエステル、ポリアクリレートエステル、ポリアクリル酸、ポリビニルアルコール等のビニル系化合物の重合体及び共重合体、ナイロン6あるいは66等のポリアミド系化合物、ポリエチレンテレフタレート等のポリエステル系化合物、セルロース等の植物由来の多糖類系化合物等が挙げられる。また、これらと磁石を組み合わせ、これらの水不溶性担体の回収を容易にすることもできる。

【0030】

水不溶性担体表面には、化学的あるいは放射線や電子線を用いてのグラフト法によって水不溶性担体表面に抗体を共有結合する方法、あるいは、化学的方法により水不溶性担体表面の官能基を介して共有結合する方法などがある。この中で官能基を介しての共重合結合方法が使用時の抗体の溶出の危険性が無く好ましい。水不溶性担体が被覆層を有する場合は、その被覆層表面に不溶化することもできる。

水不溶性担体、あるいはその被覆層表面に官能基を得る方法の一例としてハロゲン化シアン法、エピクロルヒドリン法、ビスエポキシド法、ブromoアセチルブromid法、ハロゲン化アセトアミド法等がある。具体的には、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、チオール基、酸無水化物、サクシニルイミド基、置換性ハロゲン基、アルデヒド基、エポキシ基、トレシル基などが挙げられる。抗体固定化のしやすさとして、ブromシアン法、N-ヒドロサクシンイミド基法が特に望ましい。

本発明に用いられる容器形状として、水不溶性担体を充填したカラム、フラスコ状或いは、フラスコ状ケースに水不溶性担体を充填したものが例示される。

【0031】

これらの同じ細胞上の異なる抗原分子を認識する2種類または2種類以上の抗体を直接固定化した担体を利用することもできる。CD34分子と、その他の未

分化細胞に発現する分子、例えばSCFのリセプターであるc-kit(Yardenら、EMBO J.、6巻、3341頁、1987年)、リセプターFLK-2(Mathewsら、Cell誌、65巻、1143頁、1991年)、インターロイキン-3リセプター α 鎖(Kitamuraら、Cell誌、66巻、1165頁、1991年)等との組合せも可能である。これらの分子も非常に発現頻度が少なく、分離効率が悪いが、CD34分子と同時に抗体を組み合わせることにより、これらの発現細胞を単離しうる。

【0032】

他の抗体由来の可変領域の遺伝子を組み合わせることにより、バイスペシフィック抗体、マルチスペシフィック抗体の生産も可能となる。マルチスペシフィックとは、異なる抗原もしくはエピトープを認識する抗原結合部位を少なくとも2種類以上有する抗体を示す。中でもバイスペシフィックとは、異なる抗原もしくはエピトープを認識する抗原結合部位を2種類有する抗体を示す。例えば、通常の抗体の一方の抗原結合部位がCD34抗原を認識し、もう一方の抗原結合部位をリンパ球抗原CD3等に対するバイスペシフィック化したもので、CD34陽性白血病細胞にリンパ球をより強く認識させ抗白血病効果を誘導し得る。CD3以外にも、汎リンパ球マーカー例えばCD2、CD4、CD5、CD6、CD7などが利用し得る。これらを組み合わせてIgMとして発現させれば、バイスペシフィック、マルチスペシフィックの抗体を作成し得る。こうした生産時にバイスペシフィック化する以外に、モノクローナル抗体を生産、精製し、その後に抗体同士を結合させ、バイスペシフィック化、マルチスペシフィック化することができる。

【0033】

1本鎖抗体の場合において、生産時でのバイスペシフィック化、マルチスペシフィック化が可能であり、ひとつのペプチド内に複数の抗原認識部位の組み合わせのH鎖L鎖を繰り返して並べることにより生産させることができる。生産、精製後に結合させることもできる。

H鎖及びL鎖の組み合わせによらず、H鎖のみもしくはL鎖のみのペプチドを利用することもできる。こうした抗体種の選択は、利用する用途により行うことができ、結合強度、抗原性等で選択し得る。

【0034】

これらは、異なる抗原に対してのみならず、同一分子内の異なるエピトープ、例えば異なる抗CD34抗体を組み合わせることも可能である。抗CD34抗体は、いくつか報告されている。例えば抗HPCA-2抗体（ベクトンデッキンソン社）、抗HPCA-1抗体（ベクトンデッキンソン社）、4A1（ニチレイ社）、B1.3C5（Katzら、Leuk.Res. 誌、9巻、191頁、1985年）、12.8、115.2（Andrewsら、Blood 誌、67巻、842頁、1986年）、1CH3（Wattら、Leukaemia 誌、1巻、417頁、1987年）、Tuk3（Unchanska-Zieglerら、Tissue Antigens、33巻、230頁、1989年）、QBEND10（Finaら、Blood、75巻、2417頁、1990年）、CD34（Ab-1）（Oncogene Sciences社）、Immu-133（Barrandeら、Hybridoma 誌、12巻、203頁、1993年）などが知られ、これらの抗体遺伝子を単離し、生産に用いることができる。

【0035】

本発明の一つの特徴として、組み換え抗体を利用していることであるが、組み換え抗体を利用することで、不溶性担体へ固定化しやすい抗体に改変することができる。抗体を構成しているペプチドのC末端、もしくはN末端にアミノ酸配列を付加することで、不溶性担体等の基材に効率よく固定しうる。

ヒトマウスキメラ抗体の場合、H鎖、L鎖のC末端、N末端、またはその組み合わせで本来の抗体の有していなかった配列として、塩基性または酸性のアミノ酸を含む配列を付加することである。Fc部分の途中で配列を、遺伝子的に改変し、塩基性または酸性アミノ酸にする場合も、改変した部分を含めたC末端側は、付加したアミノ酸配列と見なすことができる。ヒトマウスキメラ抗体に限らず、Fc部分を不溶性担体に結合しやすくすることは、分離器等を作成するに適している。

【0036】

1本鎖抗体において、ペプチドのC末端またはN末端に基材への固定用配列を付加することは望ましい。

付加する配列に含まれるアミノ酸として、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸を含む配列が望ましいが、基材への固定化を目的とするものであれば本発明に含まれる。

【0037】

塩基性アミノ酸として、リシン、ヒドロキシリシン、アルギニン、ヒスチジン等が挙げられる。酸性アミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。特に、リシン、グルタミン酸、アスパラギン酸を利用することは、より効率的である。

配列の長さは、特に限定されるものでないが、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸などの1アミノ酸を付加することであっても有効である。しかし、これらのアミノ酸を複数個含めた配列を付加することは、より効果的である。1本鎖抗体の様に、分子量の小さな抗体に付加した場合、ある程度長い配列を付加することで、基材との固定後に抗体が抗原と結合する際の立体障害が少なくなり、分離器としての効果がより期待される。

本配列に付加した抗体は、検出するための色素等を結合しやすくするため、抗原と結合した抗体を検出することで、抗原を検出測定することが可能となる。

【0038】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施例を説明するが、これら実施例は具体例により本発明を更に説明するものであって、本発明を限定するものではない。

【0039】

【参考例】

pG1プラスミドの調製を行った。膜結合型ヒト抗体の発現ベクターpSE（国際公開公報W095/15393）の膜貫通領域（TM）を除去し、ヒト抗体の分泌発現可能なベクターを作成した。まず、発現ベクターpSEを制限酵素SalIで消化後、切断末端を平滑化した。この反応は、DNA Blunting Kit（宝酒造社）を用い、添付のプロトコールに従って操作した。以上の処理を行った発現ベクターpSEを制限酵素ApaIで消化後、0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、C γ 1遺伝子及び膜貫通領域（TM）を含む遺伝子領域が欠失したpSEベクターDNAを抽出精製した。この反応にはGeneCleanII Kit（フナコシ社）を用い、添付のプロトコールに従って操作した。抽出したpSEベクターの制限酵素切断末端は、ウシアルカリフォスファターゼ（宝酒造社）により、自己環化が起きないよう処

理した。次に、ヒトC γ 1遺伝子の全長が組み込まれたプラスミドDNA pUCCG1を制限酵素 KpnI(宝酒造社)で消化し、切断末端を平滑末端化した後、制限酵素ApaIで消化した。この反応物を0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、C γ 1遺伝子の全長を含むDNA断片を抽出精製した。このDNA断片と、先の処理を行ったpSEベクターをライゲーションキットVer.2(宝酒造社)を用いて連結し、連結反応産物を大腸菌DH5株へ導入した。出現したコロニーから数個を選んで培養し、常法に従ってプラスミドDNAを抽出精製した。発現ベクターpSEに存在する適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られたプラスミドをpG1とした。図2にpG1プラスミドの図を示した。

【0040】

【実施例1】

抗体遺伝子を単離するためハイブリドーマAnti-My-10(ATCC HB-8483)は、10%牛胎児血清(Flow社)を添加した、RPMI-1640培地(Gibco社)で培養した。あらかじめハイブリドーマは、限外希釈法で、クローンを分離し、培養上清を測定しヒト急性骨髄性白血病細胞KG-1aへの結合性の高いクローンを選択した。この細胞 6×10^7 からTotal RNAをAGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-PhOH-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159.)にて分離した。さらに、分離したRNAからmRNAをQuickPrep mRNA Purification Kit(ファルマシア社)を使用し単離した。得られたmRNAを鋳型として、1st strand cDNAを合成した。これは、cDNA Synthesis Kit(ファルマシア社)を使用し、添付の説明書に従い行った。

【0041】

その後、PCR法により、目的の遺伝子の増幅を行った。プライマーは、マウス抗体遺伝子cDNAが合成しうる配列候補をSequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, 1991(USA NIH 発行)に掲載されたマウス抗体可変領域の遺伝子配列を参考にして複数合成し、それらプライマーを組み合わせたPCR法を行った。H鎖の取得に関し核酸配列(5' GTCCCAGGATCCTCTGAAGCAGT

CAGGCCC3')及び(5' ACAGTGGGCCCCGTCGTTTTGGCTGAGGAGA3')を、L鎖の取得に関し(5' TGTGCCCTCGAGGTGACTCAAACCTCCACTCTC3')及び(5' ATGGATACTAGTGGTGCAGCATCAGC CC3')の配列を持つプライマーから遺伝子が増幅された。増幅された遺伝子断片は、TAcloning kit(インビトロジェン社)を使用し、クローニングした。これら得られた遺伝子のH鎖及びL鎖の可変領域塩基配列を決定した。塩基配列の決定はDNAシーケンサー Ver.1.2.0, Model373A (Applied Biosystems 社)を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。標識反応は、H鎖は核酸配列(5' CTCTTGGAGGAGGGTGCCAG3')を、 κ 鎖は核酸配列(5' CCAGATTTCAACTGCTCATCAGA3')をプライマーとして、PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems社)を用い、方法は添付のプロトコールに従った。染色は、ABI社のラベリングキットを利用した。その結果、H鎖のプライマーから得られた遺伝子断片を配列表配列番号1、L鎖のプライマーから得られた遺伝子断片を配列表配列番号2に示した。

【0042】

【実施例2】

実施例1で得られた抗CD34抗体のH鎖L鎖可変領域塩基配列を含む遺伝子断片をpG1プラスミドへ組み込み、抗CD34抗体を発現可能なプラスミドを作製した。クロンのプラスミドDNAのL鎖を制限酵素XhoI(宝酒造社)及びSpeI(宝酒造社)で消化後、0.7%アガロース電気泳動ゲルにて展開し、L鎖可変領域塩基配列を含むDNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit(フナコシ社)を用い、添付のプロトコールに従って操作を行った。次に、ベクターpG1を制限酵素XhoI及びSpeIで消化後、0.7%アガロースゲルにて同様に切り出し抽出したものと連結した。次にクロンのプラスミドDNAのH鎖可変領域塩基配列を含むDNA断片を制限酵素ApaI(宝酒造社)及びBamHI(宝酒造社)で切り出し抽出した。アガロース電気泳動ゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit(フナコシ社)を用い、添付のプロトコールに従って操作を行った。次に、上記でH鎖可変領域塩基配列を含むDNA断片が挿入されたベクターpG1を制限酵素ApaI及びBamHIで消化後、0.7%アガロース電気泳動ゲルから同様に切り出し抽出したものと連結し、連結反

応物を大腸菌 JM109 株へ導入した。この連結反応には、ライゲーションキット ver.2(宝酒造社)を用いた。形質転換した大腸菌をアンピシリン含有 LB プレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミド DNA を抽出精製した。これらを組み込みに用いた制限酵素 XhoI 及び ApaI にて消化し、H鎖及びL鎖可変領域塩基配列を含む断片が挿入されたものを選び出した。以上の方法にて得られた分泌型抗体発現プラスミドを pG1My10 とした。

【0043】

【実施例 3】

実施例 2 にて得られた分泌型抗体発現プラスミド pG1My10 を、DEAEデキストラン法(Bebbington, C.R. (1991); METHODS: A Companion to Methods in Enzymology, 2(2), 136-45.) にてそれぞれ COS7 細胞へ導入した。COS7 細胞を 10% ウシ胎児血清 (FCS) 加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) にて、遺伝子組み込みの 4 日前に直径 100mm のディッシュあたり約 6.1×10^5 細胞/10ml となるよう蒔き直し、培養した。4 日後、まず上清を除き、リン酸緩衝生理食塩水 (カルシウム、マグネシウム不含) (PBS (-)) にて細胞を静かに洗浄して、4ml の 10% FCS 加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を加え、次いで DEAE デキストラン/分泌型抗体発現プラスミド混合液を細胞へ均一にふりかけて、37℃で 4 時間インキュベートした。この混合液は 20mg/ml の DEAE デキストラン (ファルマシア社 Code No. 1703 50-01, Lot. PF97323) 水溶液と、分泌型抗体プラスミドを TBS (-) (20mM Tris · HCl (pH 7.4), 0.15M NaCl) により $0.17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ とした溶液を 2 : 1 (v/v) で混合したものであり、ディッシュあたり $180 \mu\text{l}$ を添加する。インキュベーション後、上清を捨て、10% ジメチルスルフォキシド (DMSO) 添加 PBS (-) 5ml を加えて 1 分静置した。次いで上清を捨て、PBS (-) で洗浄後、 $100 \mu\text{M}$ クロロキン (Sigma 社 No. C6628) 入りの 2% FCS 添加 DMEM 7ml を加え、37℃で 3 時間インキュベートした。その後、上清を捨て、PBS (-) で洗浄して、10% FCS 添加 DMEM 10ml を加え、培養した。翌日、PBS (-) 及び DMEM にて FCS 添加 DMEM をよく除去した後、無血清の DMEM 10ml を加え、生産を開始した。

生産開始から3日後培養上清を回収し、以後約2週間生産を続けた。得られた培養上清を集め、プロテインGセファロースカラムクロマトグラフィーにより精製し、これをヒト、マウスキメラ抗CD34抗体の精製標品とした。

【0044】

精製標品のCD34抗原への結合は次の方法により確認した。1.5ml チューブに培養細胞KG1aを 1×10^6 個調製し、細胞懸濁液(2% FCS添加PBS(-))で2回洗浄した。洗浄した細胞に細胞懸濁液を $50 \mu\text{l}$ 添加し懸濁した。これに精製標品を $1 \mu\text{g}$ 加え、氷中で30分間静置した。その後さらに細胞懸濁液で3回洗浄を行った後、細胞懸濁液を $50 \mu\text{l}$ 添加し懸濁する。これにFITC標識ヤギ抗ヒトIgG(Fc)抗体(1/20 希釈 Immunotec社)を $1 \mu\text{g}$ 加え氷中で30分間静置した。その後さらに細胞懸濁液で3回洗浄を行った後、細胞懸濁液を $300 \mu\text{l}$ 添加し懸濁する。以上の処理を行った細胞にフローサイトメーター(ベクトンディッキンソン社)でレーザー光を照射することにより細胞上に結合した抗体量を蛍光にて測定した。対照として、精製標品の代わりにミエローマ由来ヒトIgG抗体を $1 \mu\text{g}$ 加え、同様の操作で細胞を処理した。図3に、精製標品のCD34抗原への結合を示した。抗CD34抗体pG1MY10由来の精製標品はCD34抗原への結合活性を保持していることが確認され、実施例1記載の特徴を有するヒトマウスキメラ抗体にはCD34抗原に対する結合活性があることが実証された。また、本精製標品によって、CD34陽性細胞を検出しうることを確認した。

【0045】

【実施例4】

抗体遺伝子をScFv抗体産生用ベクターに組み込むため、実施例2で得た遺伝子を制限酵素配列を含むプライマーを使用し、PCR法で増幅させた。H鎖用プライマーの核酸配列は、(5' GCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAG 3')及び(5' AGACGGTGACCGTGGTGCCTTGCCCC3')、L鎖用プライマーの核酸配列は、(5' TCGAGCTCACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCT3')、及び(5' CACCTGCGGCCGCCGTTTCAGCTC 3')を使用した。PCR条件はGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase(宝酒造社)を用い、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 2分を1サイクルとして、30サイクル行った。PCR装置は、型名DNA Thermal Cycler 480 (パー

キンエルマー社)を使用した。この増幅した遺伝子をH鎖は制限酵素 SfiI(東洋紡社)及びBstP(宝酒造社)で消化し、L鎖は制限酵素 SacI(宝酒造社)及びNotI(宝酒造社)で消化した後、1.5%アガロースゲルにて電気泳動し各々のDNA断片を切り出し抽出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit(フナコシ社)を用いて行った。

【0046】

ScFv抗体を産生するベクターは、抗CD34抗体遺伝子を導入する前にあらかじめ任意の抗体遺伝子を産生するプラスミドの作成を行った。Recombinant Phage Antibody System キット(ファルマシア社)を用いて、抗体を産生するハイブリドーマの任意の遺伝子を組み込んだ。そのベクターの作成方法は、このキットに添付された説明書に従った。

【0047】

この任意の抗体遺伝子を含むプラスミドを、制限酵素SacI(宝酒造社)及びNotI(宝酒造社)で消化後0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、L鎖領域が欠失したベクターDNA断片を抽出精製した。このDNA断片と、先に調製した抗CD34抗体のL鎖遺伝子を連結してL鎖遺伝子を組み入れた。次に、L鎖が入れ替わったプラスミドを制限酵素 SfiI(東洋紡社)及び、BstPI(宝酒造社)で消化後0.8%アガロースゲルにて電気泳動し、H鎖領域が欠失したベクターDNA断片を抽出精製した。このDNA断片と、先に調製した抗CD34抗体のH鎖遺伝子を連結してH鎖遺伝子を組み入れた。各々のライゲーションは、ライゲーションVer.2 キット(宝酒造社)を使用した。またアガロースゲルからのDNA断片の抽出には、GeneCleanII Kit(フナコシ社)を用いて行った。以上の操作によって得られたプラスミドを大腸菌 HB2151(ファルマシア社)へ導入した。形質転換した大腸菌をアンピシリン含有2% Glucose加2xYTプレートに蒔いて一晚培養し、出現したコロニーの中から数個を選び、常法に従ってプラスミドDNAを抽出精製した。適当な制限酵素を用いてこれらプラスミドの切断パターンを調べ、予想されたパターンに一致したものを選び出した。以上の操作によって得られた、抗CD34抗体の配列を有すScFv抗体を発現するプラスミドをpCANMY10とした。

【0048】

上記プラスミドでトランスフォームした大腸菌を2%Glucose 添加 100 μ g/ml アンピシリン添加SB培地 (3.5 %バクトトリプトン、2 %バクトイーストエキストラクト、0.5 % NaCl)にて培養した。翌日この一部を10倍量の上記培地に加え、1時間培養した後遠心し、その上清を除き、1 mMのIPTG、100 μ g/mlアンピシリン添加SB培地の等量に換えて、さらに3時間培養した後、菌体をRPAS Purification Module (ファルマシア社) のプロトコールに従って処理することにより、ペリプラズム中の抗体を回収した。得られた抗体粗画分をE tag抗体カラム (ファルマシア社) で精製した。このカラムによる精製は添付のプロトコールに従い、付属の試薬を利用して行った。以上の操作によりScFv抗体精製標品を得た。

【0049】

【実施例5】

実施例4にて得た抗CD34 ScFv抗体精製標品を使用し、ヒトCD34抗原の検出を行った。1 \times 10⁷ 個のKG-1a 細胞を0.05% TritonX100(ナカライテスク社)を含む1 mlのPBS(-) で氷上10分間処理して、細胞膜からのタンパク質抽出を行った。使用したKG-1a 細胞は、10%牛胎児血清を含むRPMI-1640 培地で培養した。抽出液10 μ lをメルカプトエタノール存在下で、3分間沸騰処理した。この液をSDSポリアクリルアミド電気泳動ゲル (ACI 社) を使用し展開した。この電気泳動は、ゲルに添付の説明書に記載の条件で行った。泳動後ゲル中のタンパク質をPVDF膜 (BioRad 社) にトランスファーした。トランスファーは、25mMトリス192mM グリシン バッファー及び Electrophoresis power Supply-EPs 600 装置 (ファルマシア社) を使用し、100V、1時間でトランスファーした。フィルターは室温で10%スキムミルク入りPBS(-) にて1時間ブロッキングした。このフィルターは、0.05%Tween-20を含むPBS(-) で洗浄後、15 μ g /ml の1本鎖抗体で1時間反応させた。

【0050】

次に、このフィルターを洗浄後、2次抗体として抗E-tag 抗体 (ファルマシア社) を 5 μ g/mlで1時間反応させた。さらに、洗浄後、3次抗体として、パーオ

キシダーゼ標識抗マウスFc抗体を $5\mu\text{g/ml}$ で1時間反応させた。このフィルターを洗浄後、1次抗体の結合した電気泳動のバンドは、ECL液（アマシャム社）で発光させ、高感度フィルム（Hyperfilm-ECL：アマシャム社）で検出した。その結果、ポジティブコントロールと同様約120 Kダルトンの位置にCD34分子のバンドが検出された。ポジティブコントロールは、抗HPCA-1抗体（ベクトンディッキンソン社）を1次抗体、パーオキシダーゼ標識抗マウスFc抗体を2次抗体としたフィルターを同様に発色させた。また、ネガティブコントロールとして1次抗体である1本鎖抗体のみを除いて、同様な処理を行った。120Kダルトンのバンドは、検出できなかった。従って、抗CD34 1本鎖抗体は、CD34分子を検出しうることを確認した。

【0051】

【実施例6】

臍帯血29mlをハンクスバランスド生理食塩水（ギブコ社）で48mlとし、フィコールパック（ファルマシア社）を3mlずつ分注した円心管4本に12mlずつ分注し、800回転/分、20分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンクス液で洗浄した。その細胞 2.0×10^7 個に対し、実施例3で生産したヒトマウスキメラ抗体 $5\mu\text{g}$ を添加し、 $1\mu\text{l/ml}$ で、氷上にて30分反応させた。それをハンクス液で洗浄後、ダイナビーズ（ダイナル社）抗ヒトIgビーズ 9×10^6 個を加え、氷上で1時間反応させた。このダイナビーズの分離操作は、付属のマニュアルに従った。得られた細胞を、14時間ダルベッコMEM培地に10%牛胎児血清で37度5%炭酸ガス雰囲気下で培養した。培養後、ピペッティングすることで細胞とビーズを完全に分離させ、ビーズは、ダイナビーズ付属のマニュアルに従い磁石により除去した。回収した細胞は、一部を使い細胞数を測定して回収細胞数とした。残りの細胞は、抗HPCA-2抗体（ベクトン）で30分氷上で反応させ、冷えた2%牛胎児血清を含む生理食塩水で洗浄し、遠心機で回収した。その細胞を、コールター社のフローサイトメーターでCD34陽性率を測定した。CD34陽性率をCD34細胞の純度とし、CD34陽性率と、回収細胞数を掛けた細胞数を回収CD34陽性細胞数とした。CD34陽性細胞の回収率は、分離前の陽性細胞数と回収した陽性細胞数から算出した。その結果、CD34陽

性細胞は、純度80.4%、回収率45.3%であった。このことから、実施例3で生産した抗体は、CD34陽性細胞を分離することが示された。

【0052】

【実施例7】

実施例3で生産したヒトマウスキメラ抗体を結合させた抗体カラムをCNBr活性化Sephrose4B(ファルマシア社)を利用して作成した。抗体のSephrose4B ビーズへの結合方法は、添付の取り扱い説明書に従った。4.0 mlのゲルにヒトマウスキメラ抗体液を反応させ、カップリング効率99.5%の効率でアフィニティーゲルを作成した。少量のガラスウールをカラム内下部に固定したガラスカラム(2cm² × 3cm)をシリコナイズし、このカラムに先に調製した1 mlのゲルを詰めた細胞分離用ゲルカラムを作成した。

臍帯血32mlにシリカ液(株式会社免疫生物研究所)を3 ml加え、37℃で1時間インキュベートした。この細胞懸濁液をハンクスバランスド生理食塩水(ギブコ社)で48mlとし、フィコールバック(ファルマシア社)を3 mlずつ分注した円心管4本にこの懸濁液を12mlずつ分注し、800 回転/分、20分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンクス液で洗浄した。その細胞 2.1×10^7 個を含む1 ml細胞懸濁液を上記抗体カラムに入れ、4℃で弱い攪拌をしつつ1時間反応させた。カラムに、10%牛胎児血清、100 ユニット/ml のペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むハンクスバランスド生理食塩水を流し洗浄した。このカラムを、10%牛胎児血清、100 ユニット/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むMEM培地(ギブコ社)を2ml 加え炭酸ガス培養器内で37℃で13時間培養した。このカラムを上下させることにより、ゲルを多少強めに攪拌し、カラムから培地を回収した。さらに、カラムに5 mlの10%牛胎児血清、100 ユニット/ml のペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むハンクスバランスド生理食塩水を流し、その液も回収した。これらの回収した液中の細胞を遠心により回収した。これらの細胞数を計測した。残りの細胞は、抗HPCA-2抗体(ベクトン)で30分氷上で反応させ、冷えた2%牛胎児を含む生理食塩水で洗浄し、遠心機で回収した。その細胞を、コールター社のフローサイトメーターでCD34陽性率を測定した。CD34陽性率をCD34細

胞の純度とし、CD34陽性率と、回収細胞数をかけた細胞数を回収CD34陽性細胞数とした。その結果、純度45.2%、回収率62.6%の結果を得た。このことから、ゲルを詰めたカラム装置からなる造血未分化細胞の分離装置が有効であることを確認した。

【0053】

【実施例8】

臍帯血29mlをハンクスバランسد生理食塩水（ギブコ社）で48mlとし、フィコールパック（ファルマシア社）を3mlずつ分注した円心管4本に12mlずつ分注し、800回転/分、20分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンクス液で洗浄した。その細胞 2.0×10^7 個に対し、実施例4で生産した1本鎖抗体25 μ gを添加し、5 μ l/mlで、氷上にて1時間反応させた。それをハンクス液で洗浄後、抗Et a g（ファルマシア社）抗体で30分反応させた。洗浄後、ダイナビーズ（ダイナル社）抗マウスIgGビーズ 9×10^6 個を加え、氷上で1時間反応させた。付属のダイナビーズのマニュアルに従い、ビーズに吸着した細胞と共に、このビーズを分離した。得られた細胞を、10%牛胎児血清を加えたダルベッコMEM培地で5%炭酸ガス雰囲気下で37℃で12時間培養した。培養後、ピペッティングする事で細胞とビーズを完全に分離させ、ビーズは、ダイナビーズ付属のマニュアルに従い磁石により除去した。回収した細胞は、一部を使い細胞数を測定して回収細胞数とした。残りの細胞は、抗HPCA-2抗体（ベクトン）で30分氷上で反応させ、冷えた2%牛胎児血清を含む生理食塩水で洗浄し、遠心機で回収した。その細胞を、コールター社のフローサイトメーターでCD34陽性率を測定した。CD34陽性率をCD34細胞の純度とし、CD34陽性率と、回収細胞数をかけた細胞数を回収CD34陽性細胞数とした。その結果、純度36.1%、回収率35.3%であった。このことから、実施例4で生産した抗体は、CD34陽性細胞を分離することが示された。

【0054】

【実施例9】

実施例4で生産した1本鎖抗体を結合させた抗体カラムをCNBr活性化 Sepharose4B（ファルマシア社）を利用して作製した。抗体のSepharose4B ビーズへの結

合方法は、添付の取り扱い説明書に従った。4.0ml のゲルに1本鎖抗体液を反応させ、カップリング効率99.0%の効率でアフィニティーゲルを作製した。少量のガラスウールをカラム内下部に固定したガラスカラム(2cm² × 4 cm) をシリコナイズし、このカラムに先に調製した1mlのゲルを詰めたゲルカラム細胞分離装置を作製した。

臍帯血28mlにシリカ液(株式会社免疫生物研究所)を3ml加え、37℃で1時間インキュベートした。この細胞懸濁液をハンスバランسد生理食塩水(ギブコ社)で48mlとし、フィコールパック(ファルマシア社)を3mlずつ分注した円心管4本にこの懸濁液を12mlずつ分注し、800回転/分、20分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンス液で洗浄した。その細胞 1.8×10^7 個を含む1ml細胞懸濁液を上記抗体カラムに入れ、1時間4度で弱い攪拌をしつつ反応させた。カラムに、10%牛胎児血清、100 ユニット/mlのペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを含むハンスバランسد生理食塩水を流し洗浄した。このカラムを、10%牛胎児血清、100 ユニット/mlのペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを含むMEM培地(ギブコ社)を2ml加え炭酸ガス培養器内で37℃で13時間培養した。このカラムを上下させることにより、ゲルを多少強めに攪拌し、カラムから培地を回収した。さらに、カラムに5mlの10%牛胎児血清、100 ユニット/mlのペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを含むハンスバランسد生理食塩水を流し、その液も回収した。これらの回収した液中の細胞を遠心により回収した。これらの細胞数を計測した。残りの細胞は、抗HPCA-2抗体(ベクトン)で30分氷上で反応させ、冷えた2%牛胎児を含む生理食塩水で洗浄し、遠心機で回収した。その細胞を、コールター社のフローサイトメーターでCD34陽性率を測定した。CD34陽性率をCD34細胞の純度とし、CD34陽性率と、回収細胞数を掛けた細胞数を回収CD34陽性細胞数とした。その結果、純度52.8%、回収率41.0%の結果を得た。このことから、ゲルを詰めたカラム装置からなる造血未分化細胞の分離装置が有効であることを確認した。

【0055】

【実施例10】

実施例 4 で作成した pCANMY10 ベクターを改良し、水不溶性担体への結合性を向上しうる抗体を作成した。1 本鎖抗体のカルボキシル末端にある E-tag 配列に続いてアミノ酸リシン残基を 3 個導入した。pCANMY10 ベクターの制限酵素部位を利用し、PCR 法でリシン残基を含む配列を導入した。その配列を配列表 4 に示した。

このベクターを大腸菌 HB2151 細胞に導入し、実施例 4 と同様に 1 本鎖抗体を作成した。

得られた抗体を、1 本鎖抗体を結合させた抗体カラムを CNBr 活性化 Sepharose 4B (ファルマシア社製) を利用して作製した。抗体の Sepharose 4B ビーズへの結合方法は、添付の取り扱い説明書に従った。4.0 ml のゲルに 1 本鎖抗体液を反応させ、アフィニティーゲルを作製した。少量のガラスウールをカラム内下部に固定したガラスカラム ($2\text{cm}^2 \times 3\text{cm}$) をシリコナイズし、このカラムに先に調製した 1 ml のゲルを詰めたゲルカラム細胞分離装置を作製した。

臍帯血 32 ml にシリカ液 (株式会社免疫生物研究所) を 3 ml 加え、1 時間 37 度でインキュベートした。この細胞懸濁液をハンクスバランスド生理食塩水 (ギブコ社製) で 48 ml とし、フィコールバック (ファルマシア社製) を 3 ml ずつ分注した円心管 4 本にこの懸濁液を 12 ml ずつ分注し、800 回転/分、20 分の条件にて分離し、単核細胞層の細胞を回収した。回収した細胞をハンクス液で洗浄した。その細胞 2.1×10^7 個を含む 1 ml 細胞懸濁液を上記抗体カラムに入れ、1 時間 4 度で弱い攪拌をしつつ反応させた。カラムに、10% 牛胎児血清、100 ユニット/ml のペニシリン、100 マイクログラム/ml のストレプトマイシンを含むハンクスバランスド生理食塩水を流し洗浄した。このカラムを、10% 牛胎児血清、100 ユニット/ml のペニシリン、100 マイクログラム/ml のストレプトマイシンを含む MEM 培地 (ギブコ社製) を 2 ml 加え 37 度炭酸ガス培養器内で 14 時間培養した。このカラムを上下させることにより、ゲルを多少強めに攪拌し、カラムから培地を回収した。さらに、カラムに 5 ml の 10% 牛胎児血清、100 ユニット/ml のペニシリン、100 マイクログラム/ml のストレプトマイシンを含むハンクスバランスド生理食塩水を流し、その液も回収した。これらの回収した液中の細胞を遠心により回収した。これらの細胞数を計測した。残りの細胞は、抗 HPCA-2 抗体 (ベクトン

）で30分氷上で反応させ、冷えた2%牛胎児を含む生理食塩水で洗浄し、遠心機で回収した。その細胞を、コールター社のフローサイトメーターでCD34陽性率を測定した。CD34陽性率をCD34細胞の純度とし、CD34陽性率と、回収細胞数を掛けた細胞数を回収CD34陽性細胞数とした。その結果、純度71.0%、回収率52.0%の結果を得た。このことから、ゲルを詰めたカラム装置からなる造血未分化細胞の分離装置が有効であることを確認すると共に、カルボキシル末端にリシン残基を導入した組換え抗体がより効率よく、細胞を分離しうることが示された。

【0056】

【発明の効果】

本発明により、造血未分化細胞の分離を特異的かつ効率よく行うことが可能となった。本発明は、白血病などの医療を目的とした造血未分化細胞の捕集、骨髄移植用細胞からのリンパ球除去などの分野において有効である。

【0057】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：351

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA,

起源

生物名：マウス

株名：anti-My-10

配列

CAG GTG CAG CTG AAG CAG TCA GGA CCT GGC CTA GTG CAG CCC TCA CAG 48

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

5

10

15

AGC CTG TCC TTC ATC TGC ACA GTC TCT GGT TTC TCA TTA ACT AGT CAT 96

[illegible]

【0058】

配列番号：2

配列の長さ : 3 3 9

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： cDNA

起源

生物名：マウス

株名: anti-My-10

配列

GAT GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA	48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
5 10 15	
GAT CAG GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AAC CTT GTA CAC AGT	96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His Ser	
20 25 30	
AAT GGA AAT ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT	144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
CCA AAT CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC CCA	192
Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAA TTC ACA CTC AAG ATC	240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Lys Ile	
65 70 75 80	
AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser	
85 90 95	
ACA CAT GTT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG GTG GAG CTG AAA	336
Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys	
100 105 110	
CGG	339
Arg	

【0059】

配列番号: 3

配列の長さ: 879

配列の型: 核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：マウス

株名：anti-My-10

配列

ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTT GGA GCC TTT TTT TTG GAG ATT TTC	48
Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Phe Gly Ala Phe Phe Leu Glu Ile Phe	
5 10 15	
AAC GTG AAA AAA TTA TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTT GTT CCT TTC TAT	96
Asn Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr	
20 25 30	
GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG AAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT	144
Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro	
35 40 45	
GGC CTA GTG CAG CCC TCA CAG AGC CTG TCC TTC ATC TGC ACA GTC TCT	192
Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Phe Ile Cys Thr Val Ser	
50 55 60	
GGT TTC TCA TTA ACT AGT CAT GGT GTA CAC TGG GTT CGC CAG TCT CCA	240
Gly Phe Ser Leu Thr Ser His Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro	
65 70 75 80	
GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GGA GTG ATA TGG GGT GCT GGA AGG ACA	288
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ala Gly Arg Thr	
85 90 95	
GAC TAT AAT GCA GCT TTC ATA TCC AGA CTG AGC ATC AGC AGG GAC ATT	336
Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Ile	
100 105 110	
TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTT AAG ATG AAC AGT CTG CAA GTT GAT GAC	384

Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asp Asp	
115	120
125	
ACA GCC ATA TAT TAC TGT GCC AGA AAT AGG TAC GAG AGC TAC TTT GAC	432
Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp	
130	135
140	
TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT	480
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly	
145	150
155	160
TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT	528
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr	
165	170
175	
CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA GAT CAG GCC TCC ATC	576
Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile	
180	185
190	
TCT TGC AGA TCT AGT CAG AAC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAT ACC TAT	624
Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr	
195	200
205	
TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAT CTC CTG ATC	672
Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile	
210	215
220	
TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC	720
Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
225	230
235	240
AGT GGA TCA GGG ACA GAA TTC ACA CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT	768
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala	
245	250
255	
GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCG CTC	816
Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu	
260	265
270	

ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG GTG GAG CTG AAA CGG GCG GCC GCA GGT 864
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Ala Ala Gly

275

280

285

GCG CCG GTG CCG TAT CCG GAT CCG CTG GAA CCG CGT GCC GCA TAG 909
Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala *

290

295

300

【0060】

配列番号：4

配列の長さ：918

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：マウス

株名：anti-My-10

配列

ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTT GGA GCC TTT TTT TTG GAG ATT TTC 48
Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Phe Gly Ala Phe Phe Leu Glu Ile Phe

5

10

15

AAC GTG AAA AAA TTA TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTT GTT CCT TTC TAT 96
Asn Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr

20

25

30

GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG AAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT 144
Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro

35

40

45

GGC CTA GTG CAG CCC TCA CAG AGC CTG TCC TTC ATC TGC ACA GTC TCT 192
Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Phe Ile Cys Thr Val Ser

50

55

60

GGT TTC TCA TTA ACT AGT CAT GGT GTA CAC TGG GTT CGC CAG TCT CCA	240
Gly Phe Ser Leu Thr Ser His Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro	
65 70 75 80	
GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GGA GTG ATA TGG GGT GCT GGA AGG ACA	288
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ala Gly Arg Thr	
85 90 95	
GAC TAT AAT GCA GCT TTC ATA TCC AGA CTG AGC ATC AGC AGG GAC ATT	336
Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Ile	
100 105 110	
TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTT AAG ATG AAC AGT CTG CAA GTT GAT GAC	384
Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asp Asp	
115 120 125	
ACA GCC ATA TAT TAC TGT GCC AGA AAT AGG TAC GAG AGC TAC TTT GAC	432
Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp	
130 135 140	
TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT	480
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly	
145 150 155 160	
TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT	528
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr	
165 170 175	
CAG TCT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA GAT CAG GCC TCC ATC	576
Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile	
180 185 190	
TCT TGC AGA TCT AGT CAG AAC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAT ACC TAT	624
Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr	
195 200 205	
TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAT CTC CTG ATC	672
Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile	

210	215	220	
TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC	720		
Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly			
225	230	235	240
AGT GGA TCA GGG ACA GAA TTC ACA CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT	768		
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala			
245	250	255	
GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCG CTC	816		
Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu			
260	265	270	
ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG GTG GAG CTG AAA CGG GCG GCC GCA GGT	864		
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Ala Ala Gly			
275	280	285	
GCG CCG GTG CCG TAT CCG GAT CCG CTG GAA CCG CGT GCC GCA AAG	909		
Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala Lys			
290	295	300	
AAG AAG TAG			918
Lys Lys ***			

305

【0061】

配列番号：5

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser His Gly Val His

【0062】

配列番号：6

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Ile Trp Gly Ala Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser

【0063】

配列番号：7

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asn Arg Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp Tyr

【0064】

配列番号：8

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

【0065】

配列番号：9

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

【0066】

配列番号：10

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

【図面の簡単な説明】

【図1】

I g Gの構造を模式的に示す。

【図2】

p G 1 プラスミドの概略図を示す。

【図3】

キメラ抗体のKG-1a 細胞への結合性を示す。

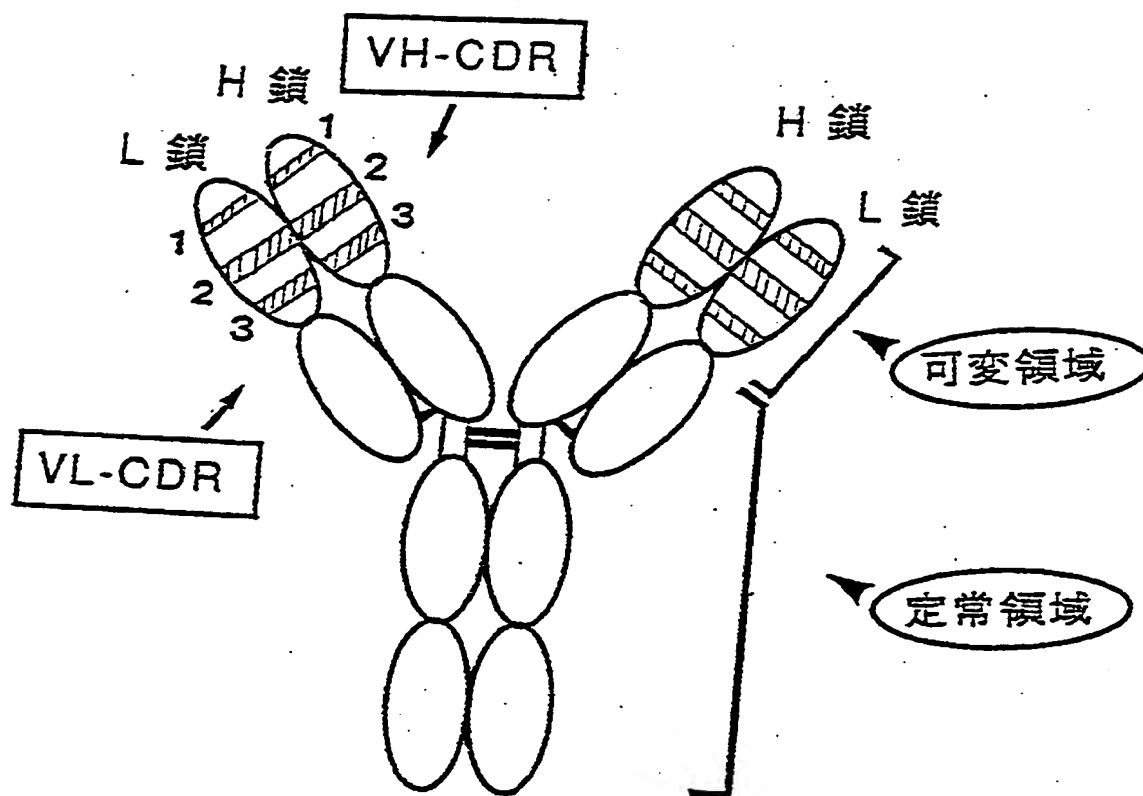
(1) は、マウスCD34抗体を反応させたポジティブコントロール。

(2) は組換え抗体がCD34陽性細胞であるKG-1a細胞を染色しうること
を示している。黒ピークは、ネガティブコントロールである白ピークに対し染色され
たことを示している。

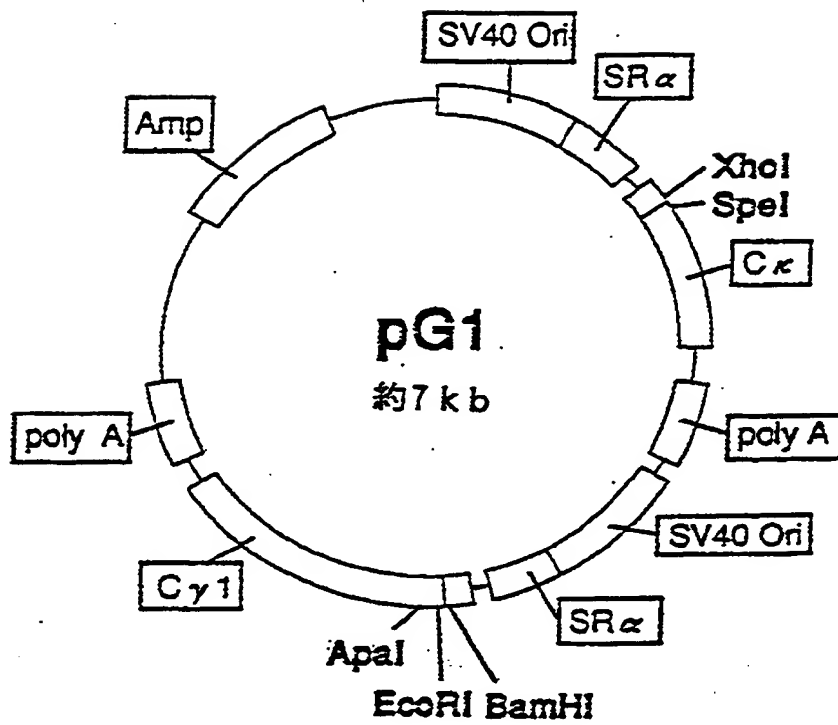
【書類名】

図面

【図1】

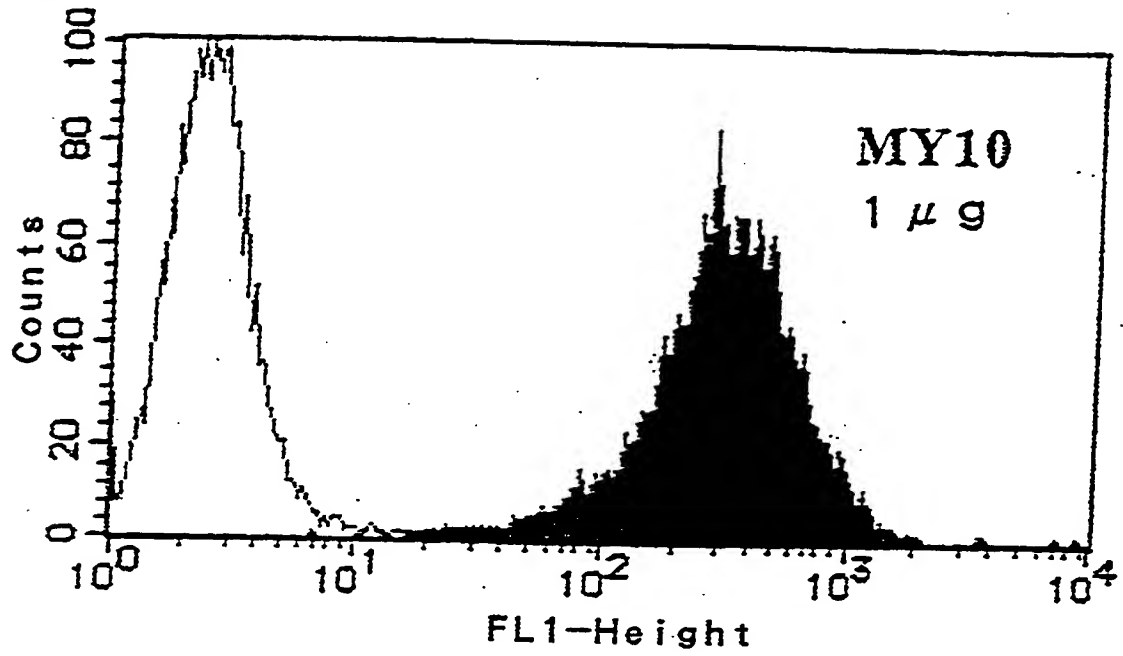


【図 2】

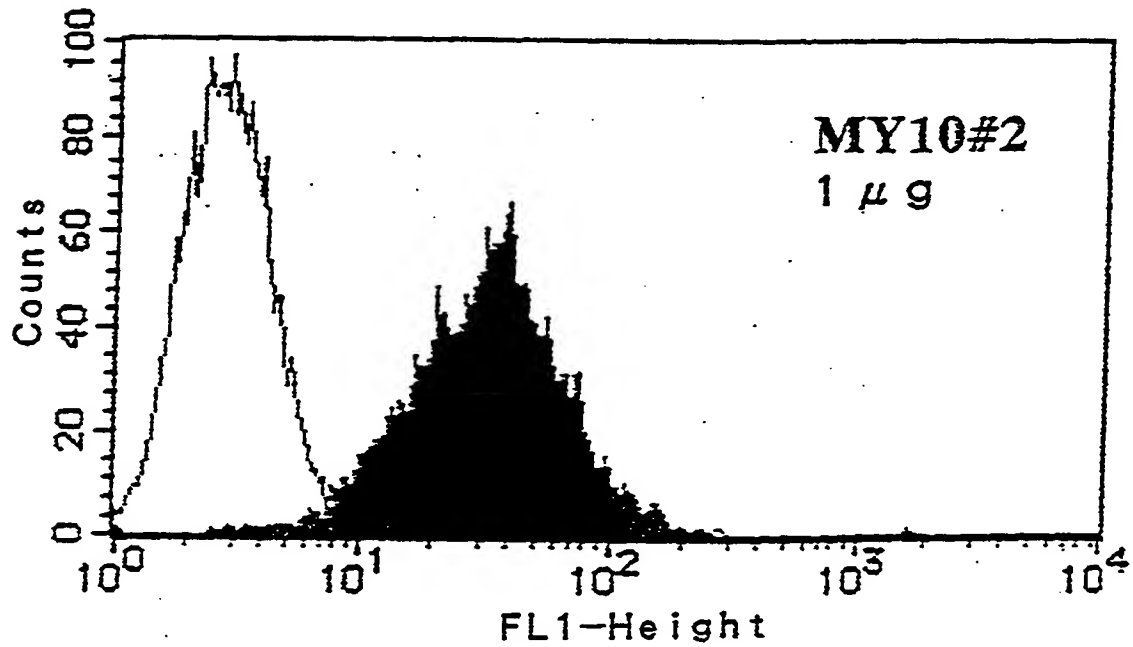


【図3】

(1) コントロール



(2) ヒトマウスキメラ抗体による染色



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 CD34陽性細胞を分離する分離装置、分離あるいは検出する方法の提供

。 【解決手段】 抗CD34抗体の遺伝子から産生したCD34認識組換え抗体（キメラ抗体、1本鎖抗体）を用いてCD34陽性細胞（造血未分化細胞）を分離する装置、分離あるいは検出する方法。

造血未分化細胞の捕集、骨髄移植用細胞からのリンパ球の除去、白血病細胞の検出などの医療の分野において有効に利用される。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000000033

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000116806

【住所又は居所】 東京都千代田区神田美土代町9番地1

【氏名又は名称】 旭メディカル株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】 100090941

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階

藤野特許事務所

【氏名又は名称】 藤野 清也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000033]

1. 変更年月日

1990年 8月16日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

氏 名

旭化成工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000116806]

1. 変更年月日 1990年 8月31日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区内幸町1丁目1番1号
氏 名 旭メディカル株式会社
2. 変更年月日 1998年 6月11日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都千代田区神田美土代町9番地1
氏 名 旭メディカル株式会社

